

# **Autoreferat**

**dr n. wet. Monika Olech**

Zakład Biochemii  
Państwowy Instytut Weterynaryjny-  
Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

**Puławy, 2019**

**1. Imię i Nazwisko.**

Monika Olech

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

- 2014** doktor nauk weterynaryjnych  
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach (Tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka molekularna lentiwirusów małych przeżuwaczy oraz diagnostyka serologiczna zakażeń tymi wirusami”)
- 2006** magister biologii, specjalność mikrobiologia  
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie- Skłodowskiej w Lublinie (Tytuł pracy magisterskiej: „Organizacja genomu i własności kompetycyjne szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* izolowanych z koniczyny rosnącej na glebie uprawnej”)

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.**

- Od 2015** adiunkt w Zakładzie Biochemii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego- Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach
- 2013-2014** asystent w Zakładzie Biochemii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego- Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach
- 2007-2013** specjalista inżynierjno- techniczny w Zakładzie Biochemii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego- Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

**4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**

**a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego (jednotematyczny cykl publikacji)**

„Badania nad występowaniem lentiwirusów małych przeżuwaczy (SRLV) w Polsce z uwzględnieniem ich charakterystyki molekularnej”

*Oświadczenia o indywidualnym wkładzie wszystkich współautorów stanowi załącznik nr 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.*

**b) wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu:**

1. **Olech M.,** Osiński Z., Kuźmak J.: Bayesian estimation of seroprevalence of small ruminant lentiviruses in sheep from Poland. *Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 147, 66-78

**IF=1,924; MNiSW=45 pkt; liczba cytowań (Web of Science) – 1**

*Wkład własny: gromadzenie materiału do badań, wykonywanie wszystkich badań laboratoryjnych, współudział w interpretacji i opracowaniu wyników, przygotowanie manuskryptu, wysłanie pracy do redakcji i wykonanie korekty po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na: 75%*

2. **Olech M.,** Valas S., Kuźmak J.: Epidemiological survey in single-species flocks from Poland reveals expanded genetic and antigenic diversity of small ruminant lentiviruses. *Plos One*, 2018, 13, 3, e193892

**IF=2,766; MNiSW=40 pkt; liczba cytowań (Web of Science) – 6**

*Wkład własny: gromadzenie materiału do badań, wykonywanie wszystkich badań laboratoryjnych, opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu, wysłanie pracy do redakcji i wykonanie korekty po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na: 90%*

3. **Olech M.,** Murawski M., Kuźmak J.: Molecular analysis of small ruminant lentiviruses in Polish flocks reveals the existence of a novel subtype in sheep. *Archives of Virology*, 2019, 164, 1193-1198

**IF=2,160; MNiSW=20 pkt; liczba cytowań (Web of Science) – 0**

*Wkład własny: wykonywanie wszystkich badań laboratoryjnych, analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu, wysłanie pracy do redakcji i wykonanie korekty po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na: 90%*

4. **Olech M.**, Kuźmak J.: Compartmentalization of subtype A17 of small ruminant lentiviruses between blood and colostrum in the infected goats is not exclusively associated to the *env* gene. *Viruses*, 2019, 11, 270, doi:10.3390/v11030270

**IF=3,761; MNiSW=30 pkt; liczba cytowań (Web of Science) – 0**

*Wkład własny: gromadzenie materiału do badań, wykonanie wszystkich badań laboratoryjnych, analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków i przygotowanie manuskryptu, wysłanie pracy do redakcji i wykonanie korekty po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na: 90%*

**- Sumaryczny współczynnik wpływu (IF)- 10, 611**

**- Suma punktów wg MNiSW- 135**

**c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

## **Wstęp**

Lentiwirusy małych przeżuwaczy (*Small Ruminant Lentiviruses* - SRLV) stanowią odrębną grupę w obrębie rodzaju *Lentivirus*, rodziny *Retroviridae*, która uwzględnia wirus choroby maedi visna owiec (VMV) i wirus zapalenia stawów i mózgu kóz (CAEV). Podobnie jak w przypadku innych lentiwirusów, w genomie SRLV wyróżnia się geny *gag*, *env* i *pol*, kodujące białka strukturalne wirionu i enzymy odwrotną transkryptazę, a także geny *vpr*, *vif* i *rev*, kodujące białka o funkcjach regulacyjnych. Objawy kliniczne towarzyszące zakażeniu SRLV związane są z postępującymi zmianami zapalnymi, wywoływanymi infiltracją tkanek przez monocyty/makrofagi oraz limfocyty, głównie w płucach, stawach, gruczole mlekowymi i ośrodkowym układzie nerwowym. Podczas gdy u owiec dominują głównie objawy ze strony układu oddechowego (*ovine progressive pneumonia* - OPP) i nerwowego to u zakażonych kóz, szczególnie młodych osobników, występują przede wszystkim zapalenia wielostawowe. Obecnie jednak, w skali światowej, większość

osobników zakażonych SRLV stanowią bezobjawowi nosiciele wirusa (Christodoulopoulos 2006).

Za wyjątkiem Australii i Nowej Zelandii, zakażenia SRLV notowane są w większości krajów świata, w których prowadzona jest hodowla owiec i kóz (Bandeira i wsp. 2009, Oem i wsp. 2012). W Polsce, nie stosuje się powszechnych programów zwalczania, lecz prowadzone badania wykazały znaczący odsetek zakażonych owiec i kóz. W odniesieniu do owiec dodatnie wyniki serologiczne stwierdzono u prawie 27% osobników, w badaniu 1015 owiec z 180 stad, z terenu województwa Podkarpackiego i Małopolskiego (Olech i wsp. 2012). W tych badaniach odsetek stad, w których stwierdzano osobniki serologicznie dodatnie wynosił prawie 52%. W analogicznych badaniach dotyczących zakażeń SRLV u kóz odsetek stad wynosił prawie 72% (Kaba i wsp. 2013). Nie mniej jednak dane na temat występowania SRLV, szczególnie u owiec są niedoszacowane i nie były przeprowadzone na terenie całej Polski.

W licznych badaniach wykazano, że występowanie zakażeń SRLV przynosi wymierne straty ekonomiczne. Związane jest to między innymi ze zwiększoną śmiertelnością, stratami w produkcji mleka, rodzeniem słabych jagniąt, częstszym brakowaniem zakażonych zwierząt oraz stratami pośrednimi powstałymi na skutek wtórnych zakażeń bakteryjnych (Leitner i wsp. 2010, Martinez-Navalon i wsp. 2013, Nowicka i wsp. 2015). Ponadto zakażenia SRLV wpływają niekorzystnie na niektóre parametry produktywności takie jak: użytkowanie rozplodowe, śmiertelność, spadek masy ciała i spadek mleczości (Keen i wsp. 1997, Junkuszew i wsp. 2016). Z uwagi na fakt, że nieznaną jest profilaktyka swoista, a zakażone zwierzęta są nosicielami wirusa przez całe życie, w wielu krajach (Szwajcaria, Francja, Wielka Brytania, Hiszpania) stosuje się programy uzdrawiania stad (Peterhans i wsp. 2004). Najskuteczniejszą metodą jest identyfikacja osobników zakażonych i ich sukcesywne usuwanie ze stada (Straub 2004). Przykładem może być tu Szwajcaria, gdzie ponad 10-letnie stosowanie programu pozwoliło zredukować stopień zakażenia z 60-80% do około 1%, jednak nie osiągnięto końcowego uzdrowienia, głównie na skutek występowania zakażeń latentnych i niewystarczającej czułości testów diagnostycznych, głównie typu ELISA (Shah i wsp. 2004a). Dlatego w programach uzdrawiania tak duże znaczenie przywiązuje się do stosowania odpowiednio czułych i swoistych testów diagnostycznych.

Jedną z podstawowych cech lentiwirusów małych przeżuwaczy jest ich wysoki stopień zmienności genetycznej, związanej przede wszystkim z aktywnością enzymu odwrotnej transkryptazy i jego zdolnością do generowania błędów w procesie transkrypcji wirusowego RNA. Prowadzi to do powstawania nowych, zmutowanych form tzw. *quasispecies*, istotnie różniących się od pierwotnego wirusa (Pasick 1998). U zakażonego zwierzęcia, występowanie określonego wariantu wirusa może ograniczać się do konkretnego organu, tkanki. Może to być związane, podobnie jak w przypadku HIV, z adaptacją genomu wirusa do różnych typów komórek gospodarza (tzw. dryft genetyczny), ze względu na różnice w presji selekcyjnej (Andresdottir i wsp. 2002). W efekcie prowadzić to może do powstania genetycznie odmiennych

subpopulacji wirusa, występujących w danym narządzie lub tkance jako tzw. zjawisko „*compartmentalization*”. Wirusy takie mogą mieć różne cechy genetyczne i właściwości fenotypowe. Wykazały to badania SRLV, izolowanych z ośrodkowego układu nerwowego i mleku, w porównaniu do form występujących we krwi obwodowej zakażonych owiec i kóz (Ramirez i wsp. 2012, Pisoni i wsp. 2007). Jednak zasięg występowania zjawiska kompartmentalizacji SRLV i kierunek zmian w ich genomie nie jest do końca poznany. Charakterystyczna dla lentiwirusów jest także zdolność pokonywania bariery gatunkowej (*cross-species infections*). Mogą one zakażać zarówno owce jak i kozy, a także wolnożyjące przeżuwacze, co wskazuje na potencjalną możliwość transmisji zakażenia na inne gatunki (Guiguen i wsp. 2000, Minardi da Cruz i wsp. 2013). Wspólne utrzymywanie owiec i kóz lub ich wspólne wypasanie uważane jest za czynnik uspasabiający do międzygatunkowych transmisji SRLV (Pisoni i wsp. 2005). Przyjmuje się, że zmienność genetyczna będąca konsekwencją zakażeń międzygatunkowych, jest wypadkową presji układu immunologicznego i zdolności adaptacyjnych genomu wirusa do komórek nowego gospodarza (Bertoni i wsp. 2000). Wysoki stopień plastyczności genomu SRLV jest także pochodną częstego występowania mutacji i rekombinacji genomu wirusa, co prowadzi może do powstawania nowych form, o zmienionych cechach biologicznych czy zmienionej zjadliwości (Pisoni i wsp. 2007a, Frasn i wsp. 2013).

Te specyficzne cechy genetyczne były podstawą wprowadzenia nowej klasyfikacji SRLV, w miejsce starej, uwzględniającej podział na wirusy występujące u owiec (MVV) i kóz (CAEV). Nowa klasyfikacja, uwzględniająca podział SRLV na pięć grup genetycznych (A-E) i szeregu podgrup, jest zasadna w aspekcie międzygatunkowej transmisji tych patogenów (Shah i wsp. 2004). Ma to również bezpośredni związek z opracowaniem nowych testów diagnostycznych z wykorzystaniem determinant antygenowych, typowych dla poszczególnych grup lub typów genetycznych (de Andres i wsp. 2013 i Carroza i wsp. 2009).

Wysoce konserwatywny charakter produktów ekspresji genu *gag* pozwalał na przyjęcie koncepcji o możliwości użycia testów serologicznych, wykorzystujących jako antygen, białko GAG uzyskiwane ze znanego izolatu, MVV-K1514 (Gogolewski i wsp. 1985, Rossati i wsp. 1999). Uważano bowiem, że występują wspólne epitopy w obrębie białka GAG (tzw. antygen grupowo-swoisty) dla obydwu wirusów MVV i CAEV. Rozwiązanie takie było przez szereg lat wykorzystywane do produkcji testów ELISA. Okazało się jednak, że efektywność takich testów była ograniczona faktem powszechnego występowania zakażeń powodowanych przez warianty wirusów indukujących syntezę przeciwciał o zmienionym powinowactwie do białek antygenowych izolatu K1514 (Grego i wsp. 2002).

Skutecznym rozwiązaniem może być zastosowanie w teście ELISA białek antygenowych reprezentujących glikoproteinę powierzchniową (*surface glycoprotein-SU*). Badania Bertoni i wsp. oraz Valasa i wsp. wykazały istnienie pięciu antygenowo czynnych domen (SU1-SU5), przy czym domena SU5, którą tworzy 70 aminokwasów z końca C' glikoproteiny powierzchniowej, tworzy fragment linearnego epitopu rozpoznawanego przez limfocyty B. Fakt, że epitop ten ma

charakter linearny a nie konformacyjny stwarza możliwość ekspresji i syntezy tego białka w systemie prokariotycznym (Bertoni i wsp. 2000, Valas i wsp. 2000), będąc idealnym kandydatem do opracowania antygeny diagnostycznego (Reina i wsp. 2009). Obok białek rekombinowanych z powodzeniem wykorzystywane były również syntetyczne peptydy (Sanjose i wsp. 2015). Istotnym jest fakt, że białko SU indukuje odpowiedź typowo-swoistą, co znacznie poszerzyło możliwości identyfikacji osobników zakażonych różnymi wariantami SRLV (Mordasini i wsp. 2006). W oparciu o takie podejście możliwa jest konstrukcja testów wykorzystujących, białka antygenowe wariantów genetycznych SRLV (tzw. *variant specific ELISA*) lub konstrukcję testów uwzględniających warianty wirusa w dominującej formie występujące w populacji zwierząt na danym obszarze (tzw. *regionally tailored ELISA tests*). Oczywiście takie postępowanie musi być poprzedzone wcześniejszą, precyzyjną analizą wariantów genetycznych, dominujących na danym terenie lub w określonej populacji zwierząt. Dlatego ten kierunek badań jest aktualnie najczęściej wykorzystywany w badaniach nad SRLV, biorąc pod uwagę możliwości opracowania nowych testów do diagnostyki serologicznej zakażeń, jak i poznanie cech genetycznych izolatów terenowych SRLV, determinujących ich nowe właściwości biologiczne.

**Główne cele badań, których wyniki przedstawiono w prezentowanym jednotematycznym cyklu publikacji, były następujące:**

- ✓ Ocena sytuacji epidemiologicznej w zakresie zakażeń lentiwirusami małych przeżuwaczy (SRLV) u owiec w Polsce
- ✓ Charakterystyka molekularna lentiwirusów małych przeżuwaczy izolowanych od owiec i kóz w Polsce, szczególnie w kontekście diagnostyki zakażeń SRLV

Ad. I Ocena sytuacji epidemiologicznej w zakresie zakażeń lentiwirusami małych przeżuwaczy (SRLV) u owiec w Polsce

**Olech M., Osiński Z., Kuźmak J.: Bayesian estimation of seroprevalence of small ruminant lentiviruses in sheep from Poland. *Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 147, 66-78**

W dotychczas przeprowadzonych badaniach epidemiologicznych na terenie Polski odsetek zwierząt, u których stwierdzono występowanie przeciwciał w

kierunku SRLV, był zróżnicowany w zależności od liczby badanych zwierząt, a także regionu, w którym przeprowadzono monitoring. Jednak informacje dotyczące odsetka zwierząt zakażonych SRLV nie można bezpośrednio odnieść do aktualnej sytuacji epidemiologicznej, ze względu na różnice w czułości i swoistości testów diagnostycznych, różnorodność metod pobierania próbek i metod statystycznych użytych w analizie badań kontrolnych. Dlatego celem badań opisanych w publikacji była ocena występowania przeciwciał przeciw SRLV u owiec na terenie całej Polski z wykorzystaniem podejścia Bayesa. Próbki do badań zostały pobrane w ramach badań monitoringowych w kierunku bruceloz owiec i kóz, i dostarczane do PIWet-PIB z poszczególnych ZHW. Obecność przeciwciał dla SRLV oznaczono testem ELISA, wykorzystując zestaw diagnostyczny firmy Institut Pourquier (Francja). Ogółem zbadano 8233 próbek surowicy uzyskanych od owiec pochodzących z 832 stad, ze wszystkich 16 województw. 1474 (17.9%) próbek było uznanych za pozytywne w teście ELISA i w 261 (31.4%) stadach wykryto przynajmniej jedno zakażone zwierzę. Jednak podstawowym problemem w interpretacji takich wyników (*apparent data*) był fakt braku systemu stratyfikacji przy zbieraniu próbek oraz pytanie o wiarygodność wyników, która limitowana jest niedoskonałością testu diagnostycznego. Dlatego, dla takiej analizy wyników opracowano modele matematyczne w systemie statystycznym R, które przy użyciu nowoczesnych technik obliczeniowych pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników. Wykorzystano do tego podejście Bayesa. Jest to pierwsze tego typu opracowanie w Polsce, w zakresie epidemiologii weterynaryjnej, zawierające taką metodologię. Stosując powyższy schemat analizie weryfikacyjnej poddano występowanie swoistych przeciwciał na poziomie stad i na poziomie zwierząt. Średni odsetek zwierząt i stad rzeczywiście zakażonych (*true prevalence*) wyniósł odpowiednio 9.3% (95% CI 6.8, 11.3) i 33.3% (95% CI 26.5, 38.2). Analiza została także przeprowadzona, uwzględniając poszczególne województwa i liczebność stad. Wykazano duże zróżnicowanie poziomu zakażenia SRLV pomiędzy badanymi obszarami. Odsetek zwierząt oraz stad zakażonych wahał się odpowiednio od 0.0 (95% CI 0.0, 0.0) do 55.3 (95% CI 50.0, 61.2) oraz od 0.0 (95% CI 0.0, 0.0) do 71.6 (95% CI 67.6, 75.9). Największy odsetek stad i zwierząt zakażonych zanotowano dla województwa kujawsko-pomorskiego, małopolskiego, pomorskiego, wielkopolskiego i warmińsko-mazurskiego natomiast najniższy zanotowano dla województwa lubelskiego i łódzkiego. Zaistniała sytuacja może wynikać ze zróżnicowanej liczebności stad w poszczególnych województwach. Analizowane wyniki wykazały bowiem częstsze występowanie zakażeń w bardziej licznych stadach, co zostało poparte analizą POPR (*posterior probabilities*). W gospodarstwach utrzymujących 100 lub więcej owiec, odsetek stad zakażonych wynosił 61.6 (95% CI 52.3, 70.0), natomiast w stadach mniejszych odsetek takich stad był niższy i wahał się od 2.5% (95% CI 0.0, 6.7) do 33.6 (95% CI 24.5, 41.7). Najwyższy odsetek zwierząt zakażonych stwierdzono także w stadach utrzymujących 100 i więcej owiec (22.0% (95% CI 16.8, 27.9)). Natomiast najniższy odsetek zwierząt zakażonych stwierdzono w stadach liczących od 1 do 5 owiec (2.3% 95% CI 0.0, 6.1). Może to być związane ze zwiększoną częstością zakażeń poprzez drogi oddechowe,



którym sprzyjają tradycyjne systemy odchowu zwierząt. Wyniki jednoznacznie wskazały, że poziom zakażenia SRLV wzrasta wraz z liczbą zwierząt utrzymywanych w stadzie. Z związku z tym przy opracowywaniu programów profilaktycznych/działaniach hodowlanych, których celem jest uwolnienie stad od omawianej choroby, należy zwrócić szczególną uwagę na liczebność owiec w stadach, jako czynnika zwiększającego ryzyko zakażeń SRLV. Większe zagęszczenie zwierząt na danym terenie wiąże się także z częstszym handlem oraz przemieszczeniem zwierząt pomiędzy stadami, co niewątpliwie jest czynnikiem sprzyjającym niekontrolowanemu rozprzestrzenianiu wirusa. Zauważono także, że wyższy poziom zakażenia SRLV może być związany z występowaniem stad mieszanych, w których owce przebywały razem z kozami. Może to być związane z faktem pokonywania przez lentiwirusy kóz (CAEV) bariery gatunkowej i możliwością zakażenia owiec. Ponadto, kontakt z wolnożyjącymi przeżuwaczami (poprzez wykorzystanie wspólnych pastwisk) może być jednym z dodatkowych czynników ryzyka zakażeń SRLV.

Zastosowane opracowanych modeli matematycznych, bazujących na podejściu Bayesa, pozwoliło na zweryfikowanie danych otrzymanych z badań serologicznych, przeprowadzonych na ograniczonej populacji zwierząt i limitowanej liczbie stad. Przedstawione dane są pierwszymi w Polsce tak szeroko zakrojonymi badaniami nad występowaniem zakażeń SRLV u owiec. Co więcej, analizy takie zostały zweryfikowane i uwiarygodnione poprzez zastosowanie nowoczesnych narzędzi statystycznych. Dane te mogą być przydatne do oceny sytuacji epizootycznej i mieć znaczenie w opracowywaniu strategii programów zwalczania zakażeń SRLV. Poznanie i identyfikacja czynników ryzyka związanych z występowaniem zakażeń SRLV jest pierwszym krokiem do ograniczenia jego rozpowszechniania, co może przynieść wymierne korzyści w produkcji owiec w Polsce.

#### Ad. II Charakterystyka molekularna lentiwirusów małych przeżuwaczy izolowanych od owiec i kóz w Polsce szczególnie w kontekście diagnostyki zakażeń SRLV

**Olech M., Valas S., Kuźmak J.: Epidemiological survey in single-species flocks from Poland reveals expanded genetic and antigenic diversity of small ruminant lentiviruses. *Plos One*, 2018, 13, 3, e193892**

Jedną z podstawowych cech SRLV jest ich wysoki stopień zmienności genetycznej w znaczący sposób związany z faktem pokonywania bariery międzygatunkowej (*cross species infection*) przez te patogeny. Wykazano, że wirusy izolowane od kóz bardziej przypominały te, dla których naturalnym gospodarzem są owce a od owiec izolowano wirusy, dla których naturalnym gospodarzem są kozy. W efekcie wykazano, że dotychczasowy, klasyczny podział na virus choroby maedi visna (MVV) i wirus zakaźnego zapalenia stawu i mózgu kóz (CAEV) nie ma zastosowania i

grupę tych patogenów określa się jako lentiwirusy małych przeżuwaczy- SRLV. Potwierdzenie zdolności SRLV do pokonywania bariery gatunkowej było podstawą nowej klasyfikacji tych patogenów, która według zaproponowanej nomenklatury, wyróżnia się pięć grup genetycznych (A-E) oraz szereg podtypów SRLV. SRLV charakteryzuje wysoki stopień zmienności genetycznej, czego konsekwencją może być powstanie wariantów antygenowych wirusa, co może w zasadniczy sposób komplikować diagnostykę serologiczną tych zakażeń. Jednak stopień takiego ryzyka jest trudny do określenia z uwagi na fakt, że nieznanym jest stopień i zakres zmienności genetycznej, szczególnie regionów genomu kodujących immunodominanty antygenowe izolatów SRLV z terenu Polski. Celem pracy było poznanie tego zjawiska w odniesieniu do lentiwirusów izolowanych od owiec i kóz w Polsce.

Do tej pory uważano, że obydwa wirusy, MVV i CAEV wykazują znaczny stopień homologii w sekwencji aminokwasowej i posiadają wspólne epitopy w obrębie białek strukturalnych. Badania wykazały jednak, że sekwencje aminokwasowe zarówno w obrębie genu *gag* jak i *env*, regionach ważnych dla indukowania odpowiedzi immunologicznej, różnią się pomiędzy poszczególnymi grupami izolatów. Ma to oczywiście bezpośredni związek z diagnostyką serologiczną zakażeń. Biorąc pod uwagę złożony i kompleksowy proces generowania odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zakażenia SRLV oraz ograniczone możliwości diagnostyczne testów bazujących na pojedynczym izolacie wirusa, zasadne było opracowanie testów ELISA wykorzystujących jako antygen, kompleks białek rekombinowanych reprezentujących kapsyd (CA) oraz domenę SU1 i SU5 glikoproteiny powierzchniowej, uzyskanych na bazie różnych typów genetycznych SRLV. Wcześniej scharakteryzowane i sklasyfikowane krajowe izolaty kóz i owiec stały się idealnym materiałem do uzyskania klonów molekularnych i ekspresji białek antygenowych. Fragmenty genu *gag* długości 990 pz kodujące białko kapsydu (CA) i częściowo macierzy (MA) oraz fragmenty genu *env* długości 250 pz i 150 pz kodujące odpowiednio domenę SU1 i SU5 zostały zamplifikowane przy użyciu metody nested PCR na bazie polskich izolatów SRLV reprezentujących określone typy genetyczne (B1, B2, A1 oraz A13). Właściwy etap klonowania w wektorze ekspresyjnym został poprzedzony subklonowaniem produktów PCR w pośrednim wektorze plazmidowym pDrive (Qiagen) i sekwencjonowaniem. Rekombinowane plazmidy pEcoli-Nterm 6xHN/SU1/Gag/SU5 poddane zostały sekwencjonowaniu, w celu potwierdzenia prawidłowej orientacji insertów. Rekombinowane plazmidy zawierające wyłącznie domeny SU1/SU5 otrzymano poprzez usunięcie fragmentu genu *gag* za pomocą enzymu *EcoRI*. Po sekwencjonowaniu i potwierdzeniu właściwej orientacji insertu wybrane rekombinowane plazmidy użyto do transformacji komórek kompetentnych BL21 (DE3). Do oczyszczenia białka chimerycznego zawierającego sześć histydynowy znacznik (HN) wykorzystano metodę chromatografii metalopowinowactwa na złożu kobaltowym. Przy analizie tych parametrów na uwagę zasługuje fakt, że w omawianych badaniach nie zastosowano białka fuzyjnego, a jedynie wprowadzono modyfikację polegającą na dodaniu sekwencji kodującej sześć

reszt histydynowo-asparaginowych na N-końcu białka. W ten sposób ograniczona została możliwość nieswoistego wiązania przeciwciał do fuzyjnej domeny białka rekombinowanego, co należało brać pod uwagę gdy białka rekombinowane otrzymywane były jako białka fuzyjne, zawierające np. sekwencje S-transferazy glutationu (GST) bakteryjnego pochodzenia. Fakt ten ma krytyczne znaczenie przy opracowywaniu testów ELISA do badań serologicznych wykorzystujących próbki surowicy krwi przeżuwaczy.

Do badań serologicznych użyto 59 próbek surowicy krwi pochodzących od 20 owiec i 39 kóz. Próbki te zbadano komercyjnym testem ELISA oraz przy użyciu nowo opracowanych testów ELISA wykorzystujących rekombinowane białka SU1/SU5 oraz SU1/Gag/SU5 reprezentujące typ genetyczny B1, B2, A1 oraz A13 SRLV. Spośród 59 próbek surowicy 47 (11 owiec i 36 kóz) było dodatnich w komercyjnym teście ELISA, podczas gdy 23, 48, 46 i 41 próbek było dodatnie z antygenem SU1/Gag/SU5 reprezentującym odpowiednio typy genetyczne B2, B1, A13 i A1. Natomiast 11, 10, 13 i 8 próbek było dodatnie z antygenem SU1/SU5 reprezentującym odpowiednio typy genetyczne B2, B1, A13 i A1. Wykorzystując ten antygen aż 38 próbek, pochodzących od 16 owiec i 22 kóz, zostało zakwalifikowanych jako ujemne. Próbki surowy krwi pochodzące od 2 owiec i 9 kóz reagowały z antygenami SU1/SU5 pochodzącymi z grupy A i B SRLV, co sugeruje na koinfekcję wirusami należącymi do różnych grup genetycznych. Różna reaktywność surowic w stosunku do różnych antygenów wyraźnie wskazują, że testy ELISA opracowane na bazie jednego szczepu nie są w stanie wykryć wszystkich zakażeń wywołanych SRLV oraz, że istnieje konieczność skonstruowania testów ELISA wykorzystujących jako antygen, kompleks białek rekombinowanych, uzyskanych na bazie różnych grup genetycznych SRLV.

Do badań molekularnych wyselekcjonowano próbki DNA od 24 zwierząt, których badania serologiczne wskazywały na istnienie nowych genotypów, zakażeń międzygatunkowych i ko-infekcji różnymi wirusami. Przedmiotem badań była analiza molekularna fragmentu genu *gag* o długości 990 pz kodującego fragment białka macierzy (MA) oraz białko kapsydu (CA), wysoce zmiennego regionu V1V2 genu *env* o długości 394 pz. Otrzymane produkty amplifikacji wklonowano do wektora plazmidowego i poddano sekwencjonowaniu metodą Sanger, a następnie sekwencje klonów (5-7) analizowano przy pomocy programu Geneious Pro 5.3 ustalając sekwencje konsensusowe. Sekwencje polskich izolatów zostały porównane z sekwencjami szczepów referencyjnych dostępnych z bazy GenBank, reprezentujących grupy genetyczne A, B, C i E. Analiza filogenetyczna trzech różnych fragmentów genomu SRLV metodą Bayesa wykazała, że polskie izolaty są wysoce zróżnicowane i należą do czterech podtypów: B1, B2, A1, A12, a także do dwóch nowych podtypów (A16 i A17), które są unikatowe dla izolatów z Polski. Izolaty pochodzące od owiec zostały zakwalifikowane do typu A12 oraz B2. Natomiast sekwencje izolatów pochodzących od kóz zostały zaszeregowane do typu A1, A12, B1 i B2 oraz nowych typów A16 i A17. Zatem u owiec i kóz wykryto zarówno wirusa należącego do grupy

A (MVV) jak i wirusa należącego do grupy B (CAEV). Dane te potwierdziły częste pokonywanie bariery gatunkowej przez SRLV spotykane w Polsce.

Różnice pomiędzy sekwencjami obliczono wykorzystując model Tamura-Nei w programie MEGA5. Różnica między sekwencjami fragmentu V1V2 izolatów tworzących nowe typy wahała się od 22 do 24% natomiast w porównaniu do szczepów reprezentujących typ A1, A2, A12 i A13 różnica wahała się od 19,6 do 24,1%. Różnica między sekwencjami fragmentu CA izolatów tworzących nowe typy wahała się od 15,5% do 16,9% natomiast w porównaniu wszystkich innych szczepów z grupy A różnica wahała się od 15,7% do 18,7% dla typu A16 i od 11,0% do 16,3% dla nowego genotypu A17. Średnia różnica między sekwencjami fragmentu MA typu A16 i A17 wynosiła 19,1%. Natomiast średnia różnica między sekwencjami należącymi do genotypu A16 i A17 a sekwencjami należącymi do grupy A wynosiła odpowiednio 16,1% i 19,6%. W zastosowanej analizie filogenetycznej przyjęto kryteria wykorzystywane przy klasyfikacji wirusa HIV (Peeters i wsp. 2000) wg. których izolaty można zakwalifikować do odrębnych grup genetycznych (A-E), jeśli różnica w ich sekwencjach nukleotydowych wynosi 25-37%. Natomiast typy genetyczne w obrębie danej grupy, tworzą izolaty, których sekwencje nukleotydowe różnią się w 15-27%. Analiza filogenetyczna klonów fragmentu V1V2 pochodzących od kozy g120(3), wykazała obecność sekwencji należących do typu A1, A12 jak i do typu B1, natomiast analiza klonów pochodzących od owcy s13 i kozy g120(2) wykazała obecność sekwencji należących do podtypu B2 i A12. Analiza filogenetyczna klonów fragmentu CA pochodzących od kozy g5675, wykazała obecność sekwencji należących do typu A17 jak i do typu B1, natomiast analiza klonów pochodzących od kozy g2991 wykazała obecność sekwencji należących do podtypu A1 i B1. Są to nieliczne przypadki opisywanych w literaturze polskiej i światowej dotyczące występowania współinfekcji SRLV, należącymi do różnych grup genetycznych. Analiza programem Recombination Detection Program (RDP3) nie wykazała zjawiska rekombinacji genetycznej.

Wygenerowane sekwencje aminokwasowe fragmentu V4V5 genu *env* i fragmentu MA/CA genu *gag* zostały porównane z sekwencjami szczepu referencyjnego MVV-K1514 (typ A1) i szczepu CAEV-Cork (typ B1) oraz z innymi sekwencjami polskich szczepów. Izolaty należące do grupy A charakteryzowały się 2 aminokwasową delecją w pozycji 80, w środkowej części białka CA co jest typowe dla sekwencji należących do grupy A. Dwa immunodominujące epitopy zlokalizowane w centralnej części białka MA i CA wykazały wysoki stopień homologii jedynie między izolatami należącymi do tej samej grupy genetycznej. Wskazuje to na fakt, że antygeny te wykazują grupowo-specyficzną immunoreaktywność. Natomiast sekwencje regionu MHR (*major homology region*) oraz sekwencje epitopu znajdującego się na C-końcu białka CA były konserwatywne pośród szczepów należących zarówno do grupy A i B. Analiza sekwencji epitopu SU5 wykazała obecność konserwatywnego regionu VRAYTYGVI, znajdującego się na N-końcu epitopu, co bezpośrednio potwierdza znaczenie białka SU5, jako antygeny w testach

diagnostycznych. Wykazano także obecność zmiennego regionu znajdującego się na C-końcu epitopu. Region ten był dość konserwatywny między izolatami w obrębie grupy B1 a także w obrębie grupy A12. Wysoką homologię zaobserwowano również wśród sekwencji szczepów s4084, s4106 i s2437, należących do podtypu B2. Jednak różniły się one istotnie od wcześniej scharakteryzowanej sekwencji szczepu 1217 należącego do tego podtypu. Analiza sekwencji należących do nowego podtypu A17 wykazała istnienie dwóch wyraźnie wyodrębnionych grup. Sekwencje szczepów g8344, g5616 i g0042 (grupa I) wykazały prawie 100% homologię, natomiast sekwencje szczepów g3085, g1561 i g5675 (grupa II) różniły się trzema substytucjami. Obie grupy wykazały wspólny motyw (KVRAYGVVDMPK/QSY) zlokalizowany w końcowej części epitopu oraz różne motywy w części C epitopu charakterystyczne dla grupy I (METQ-RRKRA/STELQLR) i grupy II (LDTH/Q-RRKRSPA/VRHLE).

Analiza immunoreaktywności epitopów w teście ELISA z użyciem białek SU1/Gag/SU5 wykazała obecność przeciwciał reagujących krzyżowo. 20 z 24 analizowanych surowic zareagowało z antygenem reprezentującym podtyp B2 i A1, 19 surowic zareagowało z antygenem reprezentującym podtyp A13 a 14 surowic zareagowało z antygenem reprezentującym podtyp B1. Stosując antygen SU1/SU5, tylko 8 surowic dało wynik dodatni z antygenami reprezentującymi podtyp B2, B1 i A1, podczas gdy 6 surowic zareagowało z antygenem reprezentującym podtyp A13. 11 surowic dało wynik ujemny. Surowice te pochodziły od zwierząt zakażonych szczepami należącymi do podtypów B2 (s4084, s4106 i s11) i A12 (s15, s5, s10), jak również do nowo zidentyfikowanych podtypów A16 (g2993) i A17 (g1561, g3085 i g5675). Analiza sekwencji epitopu SU5 tych szczepów potwierdziła, że znacznie odbiegają one od sekwencji szczepów referencyjnych (K1514(A1), Cork(B1), 1217(B2) i 0016 (A13) wykorzystanych do konstrukcji rekombinowanych antygenów SU1/SU5. Świadczy to o tym, że antygen SU5, indukuje rodzaj typowo specyficznej odpowiedzi immunologicznej. Dlatego użycie tego białka, jako antygeny, stwarza możliwość serotypowania wirusów kóz i owiec, podobnie jak w zakażeniach HIV-1, z użyciem białka odpowiadającego fragmentowi zmiennemu V3.

**Olech M., Murawski M., Kuźmk J.: Molecular analysis of small ruminant lentiviruses in Polish flocks reveals the existence of a novel subtype in sheep. *Archives of Virology*, 2019, 164, 1193-1198**

Badania serologiczne w kierunku zakażeń SRLV wykazały, że najwyższy odsetek stad i zwierząt zakażonych występuje na terenie województwa małopolskiego. Region ten, położony na południu Polski, charakteryzuje się najwyższą populacją owiec, stanowiącą blisko 30% całkowitej populacji owiec w Polsce, oraz tradycyjną hodowlą owiec i kóz w stadach mieszanych, gdzie oba gatunki są przetrzymywane razem. W pracy przyjęto hipotezę, że w stadach mieszanych kóz i

owiec występują zakażenia SRLV, które przekroczyły barierę gatunkową i przystosowały się do nowego gospodarza, co skutkować może powstawaniem wirusów o nowych właściwościach biologicznych takich jak zmienione powinowactwo do komórek nowego gospodarza czy zwiększony potencjał patogenny. Dlatego od 68 owiec i 14 kóz pochodzących z 4 stad mieszanych zlokalizowanych na terenie województwa małopolskiego pobrano krew w celu przeprowadzenia badań serologicznych i molekularnych.

Badania serologiczne wykonano wykorzystując komercyjny zestaw ID Screen MVV/CAEV Indirect Screening (Idvet, Francja) natomiast genomowy DNA izolowany z leukocytów krwi został użyty do amplifikacji fragmentu V4V5 genu *env* oraz fragmentu CA genu *gag*. Badania serologiczne wykazały występowanie przeciwciał przeciwko SRLV u 22 z 68 próbek pochodzących od wiec natomiast wszystkie próbki pochodzące od kóz były serologicznie ujemne. Przy użyciu metody nested PCR, udało się zamplifikować fragment genu *gag* w przypadku 14 z 22 próbek pochodzących od serologicznie dodatnich zwierząt natomiast specyficzny produkt dla fragmentu genu *env* udało się uzyskać tylko dla jednej próbki. Po oczyszczeniu produktów amplifikacji poddawano je sekwencjonowaniu metodą Sanger'a a otrzymane sekwencje analizowano przy pomocy programu Geneious Pro 5.3. Do porównania otrzymanych sekwencji i analizy filogenetycznej użyto dodatkowo sekwencji, dostępnych z bazy GenBank, reprezentujących znane genotypy SRLV. Analiza filogenetyczna poparta wysokimi wartościami prawdopodobieństwa *a posteriori* metodą Bayesa wykazała afiliację 9 sekwencji do genotypu A13 oraz przynależność 5 sekwencji do nowego genotypu A18. Średnia różnica w sekwencjach izolatów tworzących nowy genotyp, w porównaniu do innych podtypów z grupy A (A1-A5, A8-A9, A11-A13, A16-A17) wynosiła od 12,7 do 18,9%. Zaobserwowano także, że podtypy B1, B2 i A1 występują na terenie całego kraju podczas gdy występowanie niektórych genotypów jest ściśle związane z ich lokalizacją geograficzną. Typ genetyczny A17 wykryto jedynie na terenie województwa wielkopolskiego, typ genetycznych A16 –na terenie województwa podkarpackiego, typ genetyczny A13- na terenie województwa małopolskiego natomiast typ genetycznych A12 –na terenie województwa podlaskiego.

Wygenerowane sekwencje aminokwasowe izolatów opisanych w tej publikacji zostały porównane z sekwencjami szczepu referencyjnego MVV-K1514 (typ A1) i szczepu CAEV-Cork (typ B1) oraz z sekwencjami polskich szczepów reprezentujących genotypy A12, A13, A16 i A17. Analiza wykazała, że sekwencje epitopu znajdującego się na N- (epitop 2) i C-końcu (epitop 3) białka kapsydu były konserwatywne w obrębie grupy A. Wyjątkiem był szczep #6969 reprezentujący typ genetyczny A13, gdzie występowały trzy substytucje aminokwasowe w obrębie epitopu 2 oraz szczep #4742 reprezentujący typ genetyczny A18, gdzie występowała 1 substytucja aminokwasowa w obrębie epitopu 3.

**Olech M., Kuźmak J.: Compartmentalization of subtype A17 of small ruminant lentiviruses between blood and colostrum in the infected goats is not exclusively associated to the *env* gene. *Viruses*, 2019, 11, 270, doi:10.3390/v11030270**

Badania wielu autorów potwierdzają, że głównym czynnikiem rozprzestrzeniania zakażeń wywoływanych przez SRLV u kóz jest mleko, a w szczególności siara zakażonych matek. Odstawienie potomstwa od matek tuż po ich urodzeniu i karmienie ich krowim mlekiem jest ważnym elementem stosowanym w programach uzdrawiania stad. Z uwagi na to, że droga laktogenna odgrywa kluczową rolę w rozprzestrzeniania się SRLV u kóz, fakt ten czyni SRLV idealnym modelem do badań nad laktogenną transmisją tych wirusów. Dlatego kolejnym etapem badań było zbadanie czy komórki obecne w mleku i siarze zakażonych matek mogą być źródłem wirusów różniących się genetycznie i biologicznie od tych wykrytych we krwi obwodowej. Genomowy DNA izolowany z leukocytów krwi i komórek siary trzech kóz zakażonych podtypem A17 SRLV został użyty do amplifikacji fragmentu V4V5 genu *env*, fragmentu CA genu *gag* oraz fragmentu U3-R regionu LTR. Od wszystkich trzech kóz udało się zamplifikować fragment genu *gag* i LTR natomiast fragment genu *env* udało się zamplifikować w przypadku dwóch kóz. Około 20 klonów z każdej próbki zostało poddane sekwencjonowaniu metodą Sanger, a otrzymane sekwencje analizowano przy pomocy programu Geneious Pro 5.3. Analiza otrzymanych sekwencji przebiegała kilkutorowo i dotyczyła analizy filogenetycznej (program Geneious, metoda Bayesa), oceny stopnia zmienności genetycznej na poziomie nukleotydowym i aminokwasowym (program MEGA 6) oraz analizy statystycznej (program HyPhy). Ocena stopnia zmienności genetycznej wykazała, że zmienność genetyczna w obrębie danego kompartmentu (krew i mleko) była niewielka. Sekwencje nukleotydowe fragmentu *gag*, *env* i LTR pochodzące z krwi różniły się między sobą od 0% do 3%. Stopień zmienności sekwencje nukleotydowych pochodzących z siary kóz #1561 i #3085 był mniejszy niż 3%. Natomiast wyższą zmiennością charakteryzowały się sekwencje fragmentu genu *gag* pochodzące z siary kozy #8370, które różniły się między sobą od 0% do 11%. Sekwencje aminokwasowe fragmentu genu *gag* wykryte we krwi kóz różniły się między klonami od 0% do 2,4% natomiast wykryte w siarze- od 0% do 5,8%. Sekwencje aminokwasowe fragmentu genu *env* wykryte we krwi różniły się między klonami od 0% do 5,4% natomiast wykryte w siarze- od 0% do 6,5%. Różnica między sekwencjami nukleotydowymi pochodzącymi z siary i krwi obwodowej wynosiła od 0,5%±0,1% do 1,8%±0,3% natomiast dla sekwencji aminokwasowych od 0,8% ± 0,1% do 3,5% ± 0,8%. Niska zmienność genetyczna pomiędzy sekwencjami krwi i siary była również odzwierciedlona przez drzewa filogenetyczne, gdzie sekwencje te były przeważnie wymieszane ze sobą lub tworzyły subklastry. Wyjątkiem były sekwencje fragmentu LTR kozy #8370, które tworzyły dwa oddzielne klady z wysokim prawdopodobieństwem wystąpienia (prawdopodobieństwo *a posteriori*) >0,9. Wnikliwa analiza statystyczna wykazała jednak obecność zjawiska

kompartmentalizacji pomiędzy sekwencjami SRLV pochodzącymi z siary i krwi obwodowej u wszystkich zwierząt i to na podstawie wszystkich analizowanych fragmentów. Do analizy użyto sześciu metod statystycznych bazujących bądź na topologii drzewa filogenetycznego bądź na genetycznych dystansach między sekwencjami.

Aby ustalić czy analizowane sekwencje znajdowały się pod wpływem presji selekcyjnej obliczono średnie wartości substytucji nukleotydów w miejscach synonimicznych i niesynonimicznych, a następnie obliczono stosunek  $dn/ds$ , czyli stosunek podstawień niesynonimowych na miejsce niesynonimowe ( $dn$ ) do podstawień synonimowych na miejsce synonimowe ( $ds$ ). Wartości  $ds$  były wyższe od wartości  $dn$  we wszystkich analizowanych próbkach, a stosunek  $dn/ds$  był mniejszy niż 1 wskazując na działanie doboru negatywnego. Niemniej jednak wartości  $dn/ds$  dla niektórych próbek były znacznie wyższe sugerując istnienie przypuszczalnych regionów lub nawet pozycji aminokwasowych w białku poddawanych selekcji pozytywnej.

Przy pomocy programu N-glycosite porównano również liczbę potencjalnych miejsc N-glikozylacji (PNGS) między ENV sekwencjami pochodzącymi z siary i krwi zakażonych kóz. Analiza wykazała statystycznie istotne różnice w liczbie PNGS pomiędzy sekwencjami należącymi do tych dwóch kompartmentów. Można więc przyjąć, że genotypy SRLV występujące w mleku są selektywnie przekazywane potomstwu i mogą reprezentować warianty o nowych właściwościach biologicznych takich jak zmienione powinowactwo do komórek gospodarza i zwiększony potencjał patogenny.

### **Podsumowanie i wnioski:**

Otrzymane wyniki są unikatowe w skali Polski i wpisują się w światowy nurt badań molekularnych nad SRLV, będąc jednymi z kilku opisanych na przestrzeni ostatnich kilku lat. Ukierunkowują i ugruntowują one obowiązującą obecnie nową klasyfikację SRLV, potwierdzając istnienie pięciu nowych podtypów unikatowych dla Polski. Wprowadzają też do naszej wiedzy o zakażeniach lentiwirusami nowatorskie elementy dotyczące możliwości opracowania nowej kategorii testów diagnostycznych zdolnych do wykrywania zakażeń wariantami SRLV krążącymi w określonym regionie. Istnieje potrzeba użycia testu ELISA wykorzystującego, jako antygen, mieszaninę rekombinowanych białek reprezentujących różne typy genetyczne lub konstrukcję testów uwzględniających warianty wirusa w dominującej formie występującego w populacji zwierząt na danym obszarze. Ma to szczególne znaczenie w trakcie realizacji programów uzdrawiania stad, których skuteczność uzależniona jest od stosowania testów serologicznych. Testy ELISA bazujące na nowo



otrzymanych rekombinowanych białkach są wykorzystywane do badań w PIWet-PIB oraz w laboratorium ANSES w Niort (Francja).

1. Przedstawione dane są pierwszymi w Polsce tak szeroko zakrojonymi badaniami nad występowaniem zakażeń SRLV u owiec i kóz przy zastosowaniu nowoczesnych narzędzi statystycznych.
2. Przeprowadzone badania dowodzą, że zakażenia SRLV stanowią istotny problem w skali naszego kraju o czym świadczy znaczący odsetek rzeczywistego poziomu zakażenia.
3. Wiedza o charakterze czynników ryzyka odgrywających kluczową rolę w epidemiologii zakażeń SRLV może być pomocna przy opracowywaniu programów profilaktycznych/działaniach hodowlanych, których celem jest uwolnienie stad od zakażeń SRLV, a przez to zmniejszenie strat ekonomicznych.
4. Po raz pierwszy w Polsce przeprowadzono na tak szeroką skalę badania molekularne izolatów SRLV występujących u kóz i owiec w Polsce, które wykazały, że należą one do typów genetycznych B1, B2, A1, A12, A13, A16, A17 i A18.
5. Przeprowadzone badania wykazały, że występowanie zjawiska międzygatunkowej transmisji SRLV u kóz i owiec w Polsce ma charakter powszechny i dotyczy znacznego odsetka zakażonych zwierząt.
6. Po raz pierwszy w Polsce opracowano testy ELISA z użyciem rekombinowanych białek SU1/Gag/SU5 i SU1/SU5 reprezentujących typy genetyczne SRLV A1, A13, B1 i B2.
7. Wyniki badań serologicznych wykazały, że antygen SU1/SU5, indukuje rodzaj typowo specyficznej odpowiedzi immunologicznej. Dlatego użycie tego białka, jako antygeny, stwarza możliwość serotypowania wirusów kóz i owiec.
8. Wyniki wykazały także, że testy ELISA opracowane na bazie jednego szczepu nie są w stanie wykryć wszystkich zakażeń wywołanych lentiwirusami małych przeżuwaczy. Istnieje potrzeba użycia testu ELISA wykorzystującego, jako antygen, mieszaninę rekombinowanych białek reprezentujących różne typy genetyczne lub konstrukcję testów uwzględniających warianty wirusa w dominującej formie występującego w populacji zwierząt na danym.

**Piśmiennictwo**

1. Christodoulopoulos G., 2006. Maedi-Visna: clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. *Small Rumin Res* 62, 47-53
2. Bandeira D. A, Castro R. S., Azevedo E. O., Seixas Melo L. S., Melo C. B. 2009. Seroprevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the Cariri region, Paraíba state, Brazil. *Vet J* 180 (3), 399-401
3. Oem J. K., Chung J. Y., Byun J. W., Kim H. Y., Kwak D., Jung B.Y. 2012. Large-Scale Serological Survey of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) in Korean Black Goats (*Capra hircus aegagrus*). *J Vet Med Sci* 74(12), 1657-1659
4. Olech M., Kuźmak J., Osiński Z., Welz M. 2012. Analysis of small ruminant lentivirus infection in sheep from the Małopolska and Podkarpackie voivodeships. *Med Weter* 68 (12), 744-747
5. Kaba J., Czopowicz M., Ganter M., Nowicki M., Witkowski L., Nowicka D., Szaluś-Jordanow O. 2013. Risk factors associated with seropositivity to small ruminant lentiviruses in goat herds. *Res Vet Sci* 94, 225-227
6. Leitner G., Krifucks O., Weisblit L., Lavi Y., Bernstein S., Merin U. 2010. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Vet J* 183(3), 328-331
7. Martínez-Navalón B., Peris C., Gómez E.A., Peris B., Roche M.L., Caballero C., Goyena E., Berriatua E. 2013. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *Vet J* 197(2), 311-317
8. Nowicka D., Czopowicz M., Bagnicka E., Rzewuska M., Strzałkowska N., Kaba, J. 2015. Influence of small ruminant lentivirus infection on cheese yield in goats. *J Dairy Res* 82(1), 102-106
9. Keen J. E., Hungerford L. L., Littledike E. T., Wittum T. E., Kwang J. 1997. Effect of ewe ovine lentivirus infection on ewe and lamb productivity. *Prev Vet Med* 30, 155-169
10. Junkuszew A., Dudko P., Bojar W., Olech M., Osiński Z., Gruszecki T. M., Greguła Kania M., Kuźmak J., Czerski G. 2016. Risk factors associated with small ruminant lentivirus infection in eastern Poland sheep flocks. *Prev Vet Med* 127, 44-49
11. Peterhans E., Greenland T., Badiola J., Harkiss G., Bertoni G., Amorena B., Eliaszewicz M., Juste R. A., Krassnig R., Lafont J. P., Lenihan P., Pétursson G., Pritchard G., Thorley J., Vitu C., Mornex J. F., Pépin M. 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res* 35, 257-274
12. Straub O. 2004. Maedi-visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comp Immune Microbiol Infec Dis* 27, 1-5
13. Pasick J. 1998. Maedi-visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Can J Vet Res* 62, 241-244

14. Andresdottir V., Skraban R., Matthiasdottir S., Lutley R., Agnarsdottir G., Thorsteinsdottir H. 2002. Selection of antigenic variants in maedi-visna virus infection. *J Gen Virol* 83, 2543-2551
15. Ramirez H., Reina R., Bertolotti L., Cenoz A., Hernandez M. M., San Roma B., Glaria I., de Andres X., Crespo H., Jauregui P. et al. 2012. Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep. *BMC Vet Res* 8, e8
16. Pisoni G., Moroni P., Turin L., Bertoni G. 2007. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology* 369, 119-130
17. Guiguen F., Mselli-Lakhal L., Durand J., Du J., Favier C., Fornazero C., Grezel D., Balleydier S, Hausmann E., Chebloune Y. 2000. Experimental infection of Mouflon-domestic sheep hybrids with caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* 61, 456-461
18. Minardi da Cruz J. C., Singh D. K., Lamara A., Chebloune Y. 2013. Small ruminant lentiviruses (SRLVs) break the species barrier to acquire new host range. *Viruses* 5, 1867-1884
19. Pisoni G., Quasso A., Moroni P. 2005. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology* 339(2), 147-152
20. Bertoni G., Hertig C., Zahno M.-L., Vogt H.-R., Dufour S., Cordano P., Peterhans E., Cheevers W.P., Sonigo P., Pancino G. 2000. B-cell epitopes of the envelope glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus and antibody response in infected goats. *J Gen Virol* 81, 2929-2940
21. Pisoni G., Bertoni G., Puricelli M., Maccalli M., Moroni P. 2007a. Demonstration of coinfection with and recombination by caprine arthritis-encephalitis virus and maedi visna virus in naturally infected goats. *J Virol* 81(10), 4948-4955
22. Fras M., Leboeuf A., Labrie F. M., Laurin M. A., Singh Sohal J., L'Homme Y. 2013. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in mixed flocks: multiple evidence of dual infection and natural transmission of types A2 and B1 between sheep and goats. *Infect Genet Evol* 19, 97-104
23. Shah C., Boni J., Huder J. B., Vogt H. R., Muhlherr J., Zanoni R., Miserez R., Lutz H., Schupbach J. 2004. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: Evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology* 319, 12-26
24. De Andres X., RamõÁrez H., Bertolotti L., San RomaÁn B., Glaria I., Crespo H., et al. 2013. An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Vet Immunol Immunopathol* 152 (3-4), 277-288
25. Carrozza M. L., Mazzei M., Lacerenza D., Del Chiaro L., Giammarioli M., Marini C., Rutili D., Rosati S., Tolari F. 2009. Seroconversion against SU5 derived synthetic peptides in sheep experimentally infected with different SRLV genotypes. *Vet Microbiol* 137, 369-374

26. Gogolewski R. P., Adams D. S., McGuire T. C., Banks K. L., Cheevers W. P. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *J Gen Virol* 1985, 66, 1233-1240
27. Rossati S., Mannelli A., Merlo T., Ponti N. 1999. Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. *Virus Res* 61, 177-183
28. Grego E., Profiti M. 2002. Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 828-832
29. Valas S., Benoit C., Baudry C., Perrin G., Mamoun R. Z. 2000. Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *J Virol* 74, 6178-6185
30. Reina R., Grego E., Profiti M., Glaria I., Robino P., Quasso A., Amorena B., Rosati S. 2009. Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Vet Microbiol* 138, 251-325
31. Sanjose L., Pinczowski P., Crespo H., Perez M., Glaria I., Gimeno M., de Andres D., Amorena B., Lujan L., Reina R. 2015. Diagnosing infection with small ruminant lentiviruses of genotypes A and B by combining synthetic peptides in ELISA. *Vet J* 204, 88-93
32. Mordasini F., Vogt H., Zahno M., Maeschli A., Nenci C., Zanoni R., Peterhans E., Bertoni G. 2006. Analysis of antibody response to and immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. *J Clin Microbiol* 44, 981-991.
33. Shah C., Huder J.B., Böni J., Schönmann M., Mühlherr J., Lutz H., Schüpbach J. 2004a. Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa. *J Virol* 78(14), 7518-7522.
34. Peeters M., Esu-Williams E., Vergne L., Montavon C., Mulanga-Kabeya C., Harry T., Ibrionke A., Lesage D., Patrel D., Delaporte E. 2000. Predominance of subtype A and G HIV type 1 in Nigeria, with geographical differences in their distribution. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16, 315-325.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych)**

Od początku mojej pracy w PIWet-PIB biorę aktywny udział w działalności naukowej i badawczej Zakładu Biochemii. W okresie 12 lat pracy w Zakładzie uczestniczyłam w realizacji 26 zadań i projektów badawczych, w tym:

- w realizacji 12-tu tematów wynikających z działalności statutowej Instytutu (w 5 jako kierownik tematu), których tematyka obejmowała zagadnienia związane z epidemiologią oraz analizą zmienności genetycznej retrowirusów przeżuwaczy.

- w 2 zadaniach programu wieloletniego (w 1 z nich obecnie jako kierownik zadania) związanych z analizą epidemiologiczną zakażeń lentiwirusami małych przeżuwaczy
- w 2 projektach POLONIUM w ramach współpracy naukowej polsko-francuskiej, których tematyka dotyczyła analizy zmienności lentiwirusów małych przeżuwaczy
- jako współwykonawca realizowałam projekt programu ramowego UE „Host responses to viral infection”
- jako współwykonawca realizowałam 2 projekty badawcze MNiSW, których tematyka dotyczyła analizy czynników środowiskowych i genetycznych warunkujących poziom ryzyka zakażeń lentiwirusami u małych przeżuwaczy oraz otrzymania rekombinowanych białek lentiwirusów małych przeżuwaczy oraz opracowaniu testów ELISA z użyciem tych białek jako antygenów
- byłam kierownikiem i wykonawcą projektu badawczego ESR3 „Badanie zmienności genetycznej lentiwirusów małych przeżuwaczy w aspekcie ich laktogennej transmisji z matki na potomstwo” finansowanego przez Konsorcjum Naukowe KNOW „Zdrowe Zwierzę-Bezpieczna Żywność”
- biorę udział w realizacji dwóch projektów o dofinansowanie wiodących laboratoriów badawczych w ramach obszaru: rozwój potencjału badawczego Konsorcjum Naukowe KNOW „Zdrowe Zwierzę-Bezpieczna Żywność”
- jestem kierownikiem i głównym wykonawcą projektu finansowanego przez NCN „Charakterystyka właściwości biologicznych i molekularnych izolatów lentiwirusów małych przeżuwaczy powstałych w wyniku zakażeń międzygatunkowych”
- jestem kierownikiem i głównym wykonawcą projektu pt. „Charakterystyka lentiwirusów małych przeżuwaczy izolowanych od kóz z kliniczną formą zakaźnego zapalenia stawów i mózgu” finansowanego z środków funduszu badań własnych PIWet-PIB

Szczegółowe dane na temat publikacji, realizowanych projektów, udziału w konferencjach, działalności dydaktycznej, otrzymanych nagród, staży naukowych a także mojego udziału w działalności badawczej Zakładu Biochemii oraz innych aktywności przedstawiono w załączniku nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

**Pozostałe tematy mojej działalności badawczej (z wyłączeniem prac opisanych w jednotematycznym cyklu publikacji):**

Moje zainteresowania naukowe koncentrowały się wokół zastosowania metod serologicznych i metod biologii molekularnej do diagnostyki i badań nad zmiennością

genetyczną lentiwirusów małych przeżuwaczy oraz wirusa enzootycznej białaczki bydła oraz do badania związku pomiędzy zakażeniami SRLV a produktywnością i zdrowiem zwierząt. Można je zakwalifikować do siedmiu obszarów badawczych.

#### Zaadoptowanie i walidacja metody analizy heterodupleksów (HMA) do badań zmienności genetycznej SRLV

Jedną z podstawowych cech SRLV jest ich wysoki stopień zmienności genetycznej w znaczący sposób związany z faktem pokonywania bariery międzygatunkowej (*cross species infection*) przez te patogeny. Celem pracy było zbadanie stopnia zmienności genetycznej izolatów SRLV występujących u owiec i kóz w Polsce przy użyciu metody analizy heterodupleksów (*heteroduplex mobility assay-HMA*). Określenie zmian w sekwencji nukleotydowej jest najbardziej bezpośrednim dowodem istnienia mutacji, jednak jest to metoda zbyt kosztowna i czasochłonna, aby była wykonywana w trakcie badań przesiewowych. Szczególnie w przypadku, gdy badania dotyczą licznej grupy osobników, wskazane jest użycie techniki pozwalającej na wstępne wyselekcjonowanie zmienionych fragmentów DNA. Do najczęściej stosowanych tego rodzaju metod należy analiza heterodupleksów, która w oparciu o standardowe szczepy, reprezentujące poszczególne grupy/typy wirusów, pozwala na szybką analizę stopnia komplementarności fragmentów DNA i przynależności poszczególnych izolatów SRLV. W tym celu pobrano próbki krwi od 34 zwierząt (27 owiec i 7 kóz) pochodzących z 5 stad, z różnych województw w Polsce i wykazujących obecność swoistych przeciwciał. Próbki DNA, wyizolowane z leukocytów krwi wykorzystano w reakcji nested PCR do amplifikacji zmiennego regionu V1-V2 genu *env*. Czternaście próbek dało pozytywny wynik w reakcji PCR i poddano je analizie metodą HMA, z użyciem dwóch szczepów referencyjnych, MVV-K1514 (typ A1) i CAEV-Cork (typ B1), reprezentujących odpowiednio genotyp A i B SRLV. Osiem próbek DNA pochodzących od 6 owiec i 2 kóz, tworzyło szybko migrujące heterodupleksy z prototypowym szczepem Cork, natomiast wolno migrujące heterodupleksy z prototypowym szczepem MVV-K1514, wskazując że izolaty te należą do grupy B. Próbką DNA pochodzącą od 1 owcy tworzyła wolno migrujące heterodupleksy z prototypowym szczepem Cork, natomiast szybko migrujące heterodupleksy ze szczepem K1514. Ten profil migracyjny jasno wskazuje, że owca ta jest zakażona wirusem należącym do grupy A. W przypadku 4 próbek DNA pochodzących od 6 owiec i 2 kóz wynik analizy był niejasny. Wyniki te potwierdzają pokonanie bariery gatunkowej i występowanie krzyżowych zakażeń lentiwirusami grup A i B u owiec i kóz w Polsce. Bardzo interesujące było wykrycie u jednej owcy dwóch par heterodupleksów typowych dla grupy A i B, co może świadczyć o koinfekcji wirusów należących do obydwu tych grup.

W drugiej publikacji, próbki DNA pochodzące od 9 kóz i 34 owiec wykorzystano w reakcji nested PCR do amplifikacji zmiennego regionu V1-V2 genu *env*. Próbki te

pochodziły z 7 stad zlokalizowanych na terenie 5 województw. Dwadzieścia próbek (47%) dało pozytywny wynik w reakcji PCR, jednak ilość otrzymanego produktu w przypadku 6 próbek (1 owca i 5 kóz) była niewystarczająca do przeprowadzenia analizy metodą heterodupleksów. Dlatego do dalszej analizy użyto 14 próbek i poddano je analizie metodą HMA, z użyciem dwóch szczepów referencyjnych, MVV-K1514 (typ A1) i CAEV-Cork (typ B1), reprezentujących odpowiednio genotyp A i B SRLV. Pięć próbek DNA pochodzących od 4 owiec i 1 kozy, tworzyło szybko migrujące heterodupleksy z prototypowym szczepem Cork, natomiast 4 próbki pochodzące od owiec tworzyło szybko migrujące heterodupleksy z prototypowym szczepem K1514 wskazując że izolaty te należą odpowiednio do grupy B i A. W przypadku 8 próbek DNA pochodzących od 3 owiec i 1 kozy wynik analizy był niejasny. W tych przypadkach utworzone heterodupleksy migrowały poniżej pojedynczych nici DNA (ssDNA), zarówno z prototypowym szczepem Cork, jak i ze szczepem K1514. Wskazuje to, że izolaty te różnią się genetycznie od szczepów należących do typu A1 i B1. Próbką pochodząca od 1 kozy tworzyła dwie pary heterodupleksów typowych dla grupy A i B, co może świadczyć o koinfekcji wirusów należących do obydwu tych grup. W celu potwierdzenia otrzymanych wyników przeprowadzono analizę filogenetyczną 12 wyselekcjonowanych terenowych izolatów SRLV. Badania potwierdziły całkowitą zgodność wyników otrzymanych metodą HMA i sekwencjonowaniem. Próbki DNA, które nie można było zakwalifikować jednoznacznie do określonego genotypu wykorzystując HMA tworzyły nowe klastry na drzewie filogenetycznym.

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

1. Olech M., Croise B., Kuzmak J., Valas S. : Evidence for interspecies transmission of small ruminant lentiviruses in sheep and goats from Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2009, 53, 165-168.
2. Olech, M.; Rachid, A.; Croise, B.; Kuzmak, J.; Valas, S.: Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland. *Virus Research*, 2012, 163, 528–536.

#### Analiza czynników środowiskowych i genetycznych warunkujących poziom ryzyka zakażeń lentivirusami u małych przeżuwaczy

W zakresie produkcji zwierzęcej jednym z podstawowych priorytetów w Unii Europejskiej jest zapewnienie odpowiedniego dobrostanu zwierzętom gospodarskim i ochrona ich zdrowia. Wysoki poziom zakażenia SRLV w stadach, zmienność lokalnych warunków środowiskowych utrzymywanych zwierząt oraz mnogość czynników warunkujących rozprzestrzenianie się zakażeń SRLV powoduje, że istnieją duże problemy w opracowaniu skutecznych programów eliminacji zakażeń ze stad, stąd kluczową rolę odgrywają badania mające na celu oszacowanie poszczególnych

czynników ryzyka związanego z rozprzestrzenianiem się tego wirusa. W wyniku przeprowadzonej stratyfikacji do badań pobrano krew od 2924 owiec reprezentujących 15 ras z łącznej populacji 6470 owiec utrzymywanych w 98 stadach zarodowych, z obszaru trzech województw: lubelskiego, świętokrzyskiego i podkarpackiego. Próbki zbadano komercyjnym testem ELISA. Ponadto, w każdym z gospodarstw zebrano informacje dotyczące: wielkości stada, rasy zwierząt, systemu utrzymania, warunków klimatycznych pomieszczeń, kondycji zwierząt, występowania chorób, systemu i sposobu żywienia, kontaktu z innymi zwierzętami, poziomu użytkowości w zakresie rozrodu i wzrostu jagniąt, typu i rodzaju zabudowań inwentarskich. Dane zebrano metodą wywiadu bezpośredniego wykorzystując instrument badawczy w postaci kwestionariusza wywiadu. Do rozpoznania głównych czynników użyto metod statystycznych opartych na wskaźniku OR (*odds ratio*) powszechnie używanym jako uniwersalna miara czynników ryzyka. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy wykorzystaniu testu chi-kwadrat różnicy obserwowanych proporcji oraz metodą Mantel-Haenszela jako skorygowaną miarę ryzyka. Obliczeń dokonano za pomocą programu statystycznego „R”, przy użyciu modułu „epir”. W badaniach wykazano, że istotnym czynnikiem ryzyka związanym z występowaniem choroby jest wielkość stada. Liczebniejsze stada owiec charakteryzowały się zdecydowanie większą ilością zwierząt wykazujących odczyny serologicznie dodatnie. Wykazano, że w stadach powyżej 70 osobników ryzyko jest największe. Wykazano poważne ryzyko wzrostu zakażeń SRLV gdy owce nie miały kontaktu z innymi zwierzętami OR=3.13 (2.06, 4.76). Ponadto odnotowano zwiększony poziom zakażeń SRLV przy utrzymywaniu tryków razem z owcami (OR=1.34 (1.05, 1.71)), gdy jagnięta miały kontakt z innymi owcami tuż po narodzinach (OR=6.42 (4.86, 8.47)), gdy jagnięta były zbyt wcześnie dokarmiane paszami stałymi (wcześniej niż od 3 tyg. życia) (OR =2.74 (2.04, 3.67)). Jak pokazały wyniki, utrzymywanie stad w centrum wsi (OR= 1.55 (1.2, 1.99)), występowanie biegunek (OR = 4.22 (3.3, 5.39)), pojenie owiec z własnych ujęć wody (OR= 4.99 (3.73, 6.68)), głęboka ściółka (OR 5.99 (3.48, 10.33)), rzadkie usuwanie obornika (OR 2.21 (1.71, 2.87)), brak korytarza paszowego (OR = 2.11 (1.55, 2.88)), utrzymywanie pasz objętościowych na poddaszu użytkowym (OR = 1.82 (1.43, 2.33)) to także potencjalne czynniki ryzyka wpływające na wyższy poziom zakażeń SRLV. Zauważono także zależność pomiędzy wzrostem poziomu zakażeń SRLV a rodzajem materiału, z którego wykonany jest dach owczarni. Inny materiał niż blacha (OR= 1.86 (1.27, 2.74)), zwłaszcza eternit (OR= 2.48 (1.82, 3.36)) stanowił istotny czynnik ryzyka. Wyniki te mogą świadczyć, że porowata struktura dachówek/płyt eternitu i jego bardzo dobre parametry izolacyjne stanowią sprzyjające warunki do gromadzenia się i zachowywania aktywności dla wirusów. Doświadczenie hodowcy jak i ilość osób pracujących przy owcach nie miały wpływu na poziom zakażeń SRLV. Wysokie współczynniki OR (1.3, 1.08) odnotowano przy analizie systemu utrzymania (pastwiskowy, alkierzowy), lecz przy wartości  $p > 0,05$ , świadczy to o małej wiarygodności oszacowania tego czynnika.



W konstruowaniu programów ochrony stad przed SRLV istotną rolę powinno odgrywać wykorzystanie ras wykazujących wyższą oporność na zakażenia. Wykazano istotny statystycznie związek pomiędzy wrażliwością/podatnością niektórych ras na zakażenie SRLV. Najwyższy stopień zakażeń odnotowano u owiec rasy świniarka (57,04 % zwierząt zakażonych), natomiast u ras ile de france oraz polska owca nizinna nie odnotowano żadnych zwierząt z seropozytywnym wynikiem badań w kierunku SRLV. Analiza stopnia zakażeń pozostałych grup genetycznych wykazała że u ras tj.: wielkopolska, polska owca pogórza oraz cakiel podhalański poziom zakażeń wahał się od 22,73 do 35,5% zwierząt. U pozostałych tj.: merynos polski, żelaźnieńska, olkuska, wrzosówka, czarnogłówka, berrichon oraz linie syntetyczne BCP i SCP odsetek zakażeń wahał się od 3,85 – 16,7 % owiec.

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

1. Junkuszew A., Dudko P., Bojar W., **Olech M.**, Osiński Z., Gruszecki T.M., Greguła Kania M., Kuźmak J., Czerski G. Risk factors associated with small ruminant lentivirus infection in eastern Poland sheep flocks. *Prev Vet Med*, 127, 44–49, 2016
2. Bojar W., Junkuszew A., Dudko P., **Olech M.**, Osiński Z., Gruszeck T, Kuźmiak J. Risk factors associated with small-ruminant lentiviruses in sheepfold buildings. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 25, 3, 383–387, 2018
3. Bojar W., Junkuszew A., **Olech M.**, Kuźmak J., Szczepaniak K. Prevalence of SRLV infections in various sheep breeds. *Med. Weter.*, 74(8), 517-519, 2018

#### Wpływ występowania zakażeń SRLV na wzrost jagniąt i użytkowość rozplodową owiec

Występowanie SRLV wiąże się z wymiernymi skutkami ekonomicznymi. Wprawdzie forma kliniczna choroby najczęściej występuje u owiec starszych jednakże, można zauważyć, że w stadach w których stwierdzono zakażenia notuje się pogorszenie kondycji zwierząt, obniżenie przyrostów masy ciała, rodzenie lżejszych i słabszych jagniąt. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że owce pochodzące ze stad, w których stwierdzono występowanie SRLV, charakteryzowały się niższą płodnością w porównaniu do owiec pochodzących ze stad zdrowych. Występowanie zakażeń SRLV w stadzie miało niekorzystny wpływ na masę ciała jagniąt w 56 dniu życia. Analiza wykazała także pogorszenie odchowu jagniąt pochodzących ze stad zakażonych o ok. 6.69 punktu procentowego. Stwierdzono zwiększoną o ok 7.4% śmiertelność jagniąt pochodzących od zakażonych matek.

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

1. Bojar W., Junkuszew A., **Olech M.** Influence of SRLV infections in sheep flocks on growth and reproductive performance. Med. Weter. 2018, 74 (8), 540-543
2. Lipecka C., Junkuszew A., Kuźmak J., Gruszecki T.M., Kozaczyńska B., **Olech M.**, Bojar W., Osiński Z. Influence of small ruminant lentivirus infection on reproductive traits in ewes. Bull Vet Inst Pulawy 57, 15-18, 2013
3. **Olech M.**, Kubiś P., Lipecka C., Junkuszew A., Gruszecki T.M., Kuźmak J. Presence of specific antibodies and proviral DNA of small ruminant lentiviruses in lambs in their first weeks of live. Bull Vet Inst Pulawy 58, 507-511, 2014
4. Lipecka C., Junkuszew A., Kuźmak J., Gruszecki T.M., **Olech M.** Mortality of ewes and their progeny in a flock infected with maedi-visna virus. Bull Vet Inst Pulawy 55, 361-365, 2011

Morfologiczno-biochemiczny obraz krwi jagniąt pochodzących od matek zakażonych wirusem choroby maedi visna oraz wydajność i jakość mleka zakażonych owiec

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że u potomstwa owiec-matek zakażonych SRLV obserwowano zmiany morfologiczno-biochemicznego obrazu krwi w stosunku do rówieśników pochodzących od matek nie wykazujących swoistych przeciwciał w kierunku SRLV. W pierwszym miesiącu życia (I termin) u jagniąt matek zakażonych wykazano istotnie mniejszą liczbę leukocytów, procentowo większy udział limfocytów (ok. 19%) i mniejszy granulocytów (ok. 19%) w stosunku do jagniąt pochodzących od matek zdrowych. Uległy zmianie również wskaźniki czerwono krwinkowe. U jagniąt od matek zakażonych zwiększyła się istotnie objętość elementów komórkowych (hematokryt) do objętości krwi pełnej, przy czym krwinki czerwone tych zwierząt odznaczały się mniejszą masą i stężeniem hemoglobiny. Zawartość krwinek płytkowych utrzymywała się w obu grupach jagniąt młodszych w dolnych granicach norm referencyjnych, a u starszych nastąpił ich spadek, szczególnie od matek zakażonych. Badania aktywności enzymów, szczególnie LDH i ALP, oraz zawartość kwasu moczowego bez względu na wiek jagniąt była wyższa u potomstwa matek zakażonych. Kontrolę mleczości w okresie 2 miesięcy (co 14 dni) przeprowadzano metodą klasyczną z zastosowaniem oksytocyny. W próbkach mleka oznaczano zawartość tłuszczu, białka i laktozy, a przy użyciu testu TOK i oceny zawartości komórek somatycznych w mleku określano zdrowotność gruczołu mlekowego. Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że maciorki zakażone SRLV w okresie dwumiesięcznej laktacji produkowały mniej mleka średnio o 7,09 kg, ale o wyższej zawartości białka (o 0,18%) i tłuszczu (o 0,21%) i niższym poziomie laktozy (o 0,21%) w porównaniu do maciorek wolnych od wirusa.

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

1. Lipecka C., **Olech M.**, Gruszecki T.M., Junkuszew A., Kuźmak J. Haematological and biochemical parameters in blood of lambs born to maedi-visna virus –infected and uninfected ewes. Bull Vet Inst Pulawy 54, 135-139, 2010
2. Lipecka C., Szymanowska A., Szymanowski M., Junkuszew A., Gruszecki T.M., Kuźmak J., **Olech M.** Milk yield and quality in sheep with maedi-visna virus. Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego, t. 6 (2010), nr 1, 51-59

Badania molekularne wirusa białaczki bydła oraz opracowanie metody real-time PCR do wykrywania prowirusowego DNA wirusa enzootycznej białaczki bydła

Enzootyczna białaczka bydła (EBB) jest zakaźną i zaraźliwą chorobą o wybitnie przewlekłym przebiegu. Czynnikiem etiologicznym EBB jest wirus z rodziny *Retroviridae*, rodzaju *Deltaretrovirus*. EBB jest umieszczona na liście chorób podlegających obowiązkowi zgłaszania i zwalczania z urzędu. W badaniach diagnostycznych EBB stosuje się głównie metody serologiczne (AGID, ELISA). Szerokie stosowanie metod serologicznych napotyka jednak na pewien problem. U pewnego odsetka zwierząt (od 2 do 10%) nie stwierdza się przeciwciał, ale możliwe jest wykazanie ekspresji białek lub obecności prowirusa. Dlatego zgodnie z zaleceniami OIE proponuje się zastosowanie metody PCR jako metody alternatywnej do wykrywania DNA wirusa EBB. W związku z tym podjęto się zadania opracowania metody Real-Time BLV PCR, pozwalającej na ilościową analizę prowirusowego DNA BLV w genomowym DNA izolowanym z leukocytów krwi bydła. Zaprojektowano startery pozwalające na amplifikacje fragmentu konstytutywnego genu *pol* wirusa BLV o wielkości 120pz a także specyficzną sondę typu TaqMan znakowaną FAMBHQ1. Walidacja opracowanej metody Real-Time BLV PCR wykazała, że test wykrywa ona pojedyncze kopie prowirusa i cechuje się wysoką powtarzalnością i odtwarzalnością. Następnie testem tym zbadano 46 próbek DNA pochodzących od krów, które w badaniach serologicznych zostały zakwalifikowane jako dodatnie lub wątpliwe a pochodziły ze stad uznanych za wolne od EBB. Dodatkowo badano 6 próbek DNA uzyskanych z węzłów chłonnych bydła, wykazujących w trakcie badania poubojowego zmiany wskazujące na EBB. Uzyskane wyniki potwierdziły wyższą czułość metody real time PCR w porównaniu do klasycznego PCR oraz wskazały na zależność pomiędzy wykrywalnością prowirusa a liczbą kopii. Otrzymane wyniki wskazują, że opracowany test Real-Time BLV PCR jest przydatny do wydania ostatecznego wyniku w kierunku EBB, zwłaszcza w odniesieniu do próbek o niewyjaśnionym statusie serologicznym lub kiedy do badania dostępne są tylko próbki DNA izolowane z tkanek. Wyniki tych badań były podstawą do zaakceptowania tej techniki przez Komisję Norm i Standardów OIE, jako testu zalecanego do diagnostyki EBB i opisanie jej w ostatnim wydaniu podręcznika Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE 2018, rozdział

3.4.9. Badanie zmienności genetycznej BLV, szczególnie w odniesieniu do izolatów terenowych BLV, jest istotnym zagadnieniem, mającym związek z usprawnieniem diagnostyki serologicznej i molekularnej zakażeń oraz poznaniem zjawiska ewolucji wirusa w kierunku powstawania form o nowych cechach biologicznych. Celem podjętych badań była analiza zmienności genetycznej 44 izolatów BLV występujących u zakażonego bydła w krajach Europy Środkowo-Wschodniej i Syberii. Analiza filogenetyczna fragmentu genu *env* o długości 444pz wykazała, że większość badanych izolatów należała do genotypu G4 i G7 oraz nowego genotypu G8, który do tej pory był identyfikowany tylko w Chorwacji. Dalsza analiza, poparta wysokimi wartościami *bootstrap* i wysokimi wartościami prawdopodobieństwa *a posteriori* w metodzie Bayesa, wykazała przynależność tych izolatów do odrębnych podgrup G7A, G7B, G7C, grupujących izolaty wyłącznie z Rosji, Ukrainy i Polski. Analogicznie, w genotypie G4 większość izolatów można było pogrupować w obrębie dwóch podgrup G4A i G4B, które zawierają wyłącznie izolaty z Polski, ze ściśle geograficznie określonych regionów.

Następnie podjęto się charakterystyki mutacji występujących w regionie LTR BLV izolowanych od 5 serologicznie dodatnich krów pochodzących ze stad posiadających status wolny od BLV, ale takich, w których zanotowano przypadki nowo pojawiających się zakażeń tym wirusem. W tym celu fragment LTR amplifikowano w reakcji Fusion PCR, swoisty produkt pozyskiwano z żelu i po oczyszczeniu poddawano sekwencjonowaniu. Analiza sekwencji wykazała istnienie mutacji lokalizowanych między innymi w regionie GRE (*glucocorticoid responsive element*), DAS (*downstream activator sequence*), IRF (*interferon regulatory factor-binding site*), TRE2, 3 (*cis-acting Tax response elements*) oraz NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B binding sites*). Zmiany te mogą mieć związek ze zmienioną aktywnością wirusowego promotora, modulując proces replikacji BLV.

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

1. Rola-Łuszczak M., Finnegan C., **Olech M.**, Choudhury B., Kuźmak J. Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *J Virol Methods* 189, 2013, 258-264
2. Rola-Łuszczak M., Pluta A., **Olech M.**, Donnik I., Petropavlovskiy M., Gerilovych A., Vinogradova I., Choudhury B, Kuźmak J. The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny. *Pols One*, 2013, 8 (3), e58705
3. Pluta A., Rola-Łuszczak M., **Olech M.**, Kuźmak J. Genetic diversity of the long terminal repeat of bovine leukaemia virus field isolates. *Bull Vet Inst Pulawy*, 59, 447-450 2015

### Charakterystyka lentiwirusów małych przeżuwaczy powstałych w wyniku zakażeń międzygatunkowych

Lentiwirusy zwierząt stały się interesującym modelem do badań nad mechanizmami przekraczania bariery gatunkowej oraz przystosowania się wirusów do nowego gospodarza, a także zjawiska powstawania nowych form tych patogenów tzw. *emerging pathogens*. Łatwość z jaką SRLV pokonują barierę gatunkową owce/kozy i adaptują się do nowego gospodarza może skutkować również przeniesieniem zakażenia na inne wrażliwe przeżuwacze. Hipoteza ta zostanie zweryfikowana w odniesieniu do bydła, utrzymywanego razem z zakażonymi kozami i owcami oraz przeżuwaczy wolnożyjących, mających kontakt z takimi zwierzętami.

Jak dotąd, 198 próbek osocza pochodzących od zwierząt wolnożyjących (jelenie, sarny) zostało zbadane komercyjnym testem ELISA dedykowanym wykrywaniu przeciwciał przeciwko SRLV u zwierząt hodowlanych oraz nowo opracowanym testem ELISA z użyciem rekombinowanych białek SU1/Gag/SU5, reprezentujących grupy genetyczne A1, A13, B1 i B2 lentiwirusów małych przeżuwaczy (Olech i wsp. 2012). W tym drugim, zamiast przeciwciał drugorzędowych (*peroxidase conjugated monoclonal anti -goat/sheep antibody*) zostało użyte białko G. Wnikliwa analiza metodą Bayesa wykazała, że przy zastosowaniu rekombinowanych białek SU1/Gag/SU5 rzeczywisty poziom zakażenia wahał się od 5.3% (95% CI 0.3, 12.5) do 24.6% (95% CI 3.3, 38.5) natomiast używając komercyjnego testu ELISA stopień zakażenia wyniósł 2.5% (95% CI 0.2, 6.6). Są to pierwsze takie badania w Polsce i na świecie wskazujące, że wolnożyjące przeżuwacze mogą być rezerwuarem i źródłem transmisji lentiwirusów małych przeżuwaczy.

Ponadto, przy użyciu rekombinowanych białek reprezentujących typy genetyczne A1, A13, B1 i B2 SRLV zostało zbadane 82 surowice pochodzące od bydła utrzymywanego razem z zakażonymi SRLV owcami i kozami. Podwyższoną reaktywność zanotowano w przypadku 17 z 82 (20,7%) badanych surowic. Od 7 wyselekcjonowanych zwierząt została pobrana krew w celu otrzymania komórek jednojądrzastych i hodowli makrofagów – *monocyte derived macrophages* (MDM) dla potwierdzenia replikacji wirusa (metoda SG-PERT) i oceny jego cech biologicznych (obserwacja mikroskopowa na obecność syncytiów, mianowanie wirusa). Wyizolowane DNA przeznaczono do badań molekularnych w oparciu o amplifikację fragmentu genu *gag* i *env*. Po oczyszczeniu produkty PCR zostały wklonowane do wektora plazmidowego. Po wstępnej selekcji pozytywnych klonów trawieniem enzymami restrykcyjnymi, plazmidowe DNA zostało oczyszczone, poddane sekwencjonowaniu i analizie. Aktywność odwrotnej transkryptazy została potwierdzona w przypadku supernatantów pochodzących ze wszystkich hodowli komórkowych natomiast obecność efektu cytopatycznego (tworzenie się syncytiów) zaobserwowano w przypadku 4 hodowli. DNA otrzymane z komórek *in vitro* użyto do amplifikacji fragmentu genu *gag* i *env*. W przypadku fragmentu genu *env* nie

uzyskano specyficznych produktów amplifikacji natomiast w przypadku trzech próbek udało się zamplifikować fragment genu *gag* o długości 625 pz kodujący białko kapsydu. Analiza filogenetyczna wykazała przynależność jednej sekwencji do genotypu B1 oraz przynależność dwóch sekwencji, pochodzących od krów z innego stada, do genotypu A12 SRLV. Dane te wskazują, że pojawianie się nowych wirusów, które posiadają określony potencjał zoonotyczny, może stanowić poważny problem dla zdrowia publicznego.

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

1. Prevalence of small ruminant lentiviruses (SRLV) infection in wildlife ruminants from Poland- praca przygotowana do opublikowania.

#### Badania dotyczące izolacji i identyfikacji komórek epitelialnych z mleka kóz zakażonych SRLV

Lentivirusy małych przeżuwaczy charakteryzuje duża zmienność genetyczna, co skutkuje powstawaniem licznych form genetycznych wirusa, w jednym organizmie tzw. pseudogatunków (*quasispecies*). Na skutek presji selekcyjnej układu immunologicznego gospodarza, dochodzi do wyodrębnienia form dominujących, zasiedlających poszczególne tkanki lub narządy, tzw. zjawisko kompartmentalizacji. W warunkach tych proces taki skutkować może powstawaniem nowych form wirusów o nowych właściwościach biologicznych takich jak zmienione powinowactwo do komórek gospodarza czy zwiększony potencjał patogenny. Do tej pory, w przypadku SRLV opisano takie procesy związane z tworzeniem odrębnych form genetycznych SRLV występujących w ośrodkowym układzie nerwowym, komórkach błony maziowej stawów czy w komórkach gruczołu mlekowego/siarze. To ostatnie zagadnienie jest ważne biorąc pod uwagę fakt, że droga laktogenna jest podstawową drogą transmisji zakażeń SRLV u kóz. Znaczący udział w takiej transmisji wirusa przypisuje się komórkom epitelialnym, obecnym w mleku. Pierwszym celem pracy było zbadanie czy komórki epitelialne są podatne na produktywnie zakażenie SRLV. Od czterech zakażonych owiec pobrano próbki mleka i wypreparowane zostały komórki epitelialne w hodowli komórkowej *in vitro*, a ich epitelialny charakter potwierdzono immunocytochemicznie z monoklonalnymi przeciwciałami dla cytokeratyny. Analiza PCR potwierdziła obecność prowirusowego DNA. Ekspresję białek wykazano zarówno metodą immunocytochemiczną z zastosowaniem anty-p27 mAbs, jak i metodą Western blot. Ponadto wykryto białko p27 w supernatantach pochodzących z hodowli sugerując aktywną produkcję cząstek wirusowych. Wyniki te wykazały, że komórki epitelialne pochodzące od zakażonych zwierząt mogą

odgrywać ważną rolę w przekazywaniu wirusa z matki na potomstwo drogą laktogenną.

Drugim celem badania, które jest aktualnie wykonywane, jest wykazanie czy SRLV, obecne w komórkach epitelialnych mleka lub siary naturalnie zakażonych kóz, stanowią pod względem genetycznym, odrębną subpopulację wirusa. Do tej pory zidentyfikowano 3 stada kóz, w których występują osobniki zakażone SRLV, należącymi do różnych grup genetycznych. Od 37 zwierząt pobrano krew w celu izolacji DNA i przeprowadzenia analizy molekularnej. Równolegle od wszystkich zwierząt zostały pobrane próbki siary i mleka i wypreparowane zostały komórki epitelialne w hodowli komórkowej *in vitro*. Obecność zintegrowanego prowirusowego DNA potwierdzono amplifikując fragment 625pz z genu *gag*. Metodą immunocytochemiczną potwierdzono obecność białka kapsydu p28 SRLV i cytokeratyny w cytoplazmie komórek. Wybrane próbki zostały poddane sekwencjonowaniu techniką NGS. Obecnie trwają prace dotyczące analizy sekwencji przy użyciu narzędzi bioinformatycznych i oceniony zostanie stopień różnorodności sekwencji wirusów z komórek epitelialnych w stosunku do tych, pozyskanych z leukocytów krwi obwodowej.

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

1. Materniak M., Kubiś P., Rola-Łuszczak M., **Olech M.**, Kuźmak J. Evidence for maedi-visna virus in milk epithelial cells of naturally infected ewes. Bull Vet Inst Pulawy, 55, 563-567, 2011

## 6. Podsumowanie dorobku publikacyjnego

Jestem autorem lub współautorem 22 publikacji z listy JCR oraz 3 publikacji z listy MNiSW (łącznie z osiągnięciem habilitacyjnym). Pełny wykaz publikacji znajduje się w załączniku 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

<b>Łączna liczba publikacji</b>	<b>25</b>
Liczba publikacji w czasopismach z listy JCR	22
w tym: opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora	11
w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora	11
w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	4
Liczba publikacji w czasopismach spoza listy JCR	3
<b>Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF)</b>	<b>25,801</b>
w tym: opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora	10.831
w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora	14.970
w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	10,611
<b>Suma punktów MNiSW</b>	<b>528</b>
w tym: opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora	235
w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora	293
w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	135
Liczba cytowań według bazy Web of Science	114
Liczba cytowani według bazy Scopus	115
Indeks Hirscha według bazy Web of Science	6
Indeks Hirscha według bazy Scopus	6
Liczba monografii	7
Liczba komunikatów konferencyjnych	28



Zestawienie publikacji z uwzględnieniem wskaźnika Impact Factor, liczby punktów MNiSW oraz liczby cytowań.

Czasopismo	Rok publikacji	Liczba publikacji	Impact factor	Liczba punktów MNiSW	Liczba cytowań
Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy	2009	1	0,218	20	7
	2010	1	0,321	20	3
	2011	1	0,414	20	0
	2011	1	0,414	20	3
	2012	1	0,377	20	1
	2013	1	0,365	20	2
	2014	1	0,357	20	1
	2015	1	0,468	20	0
Virus Research	2012	1	2,745	25	28
Preventive Veterinary Medicine	2017	1	1,924	45	1
	2016	1	1,987	40	14
Ploese One	2018	1	2,766	40	6
	2013	1	3,534	40	35
Archives of Virology	2019	1	2,160	20	0
Viruses	2019	1	3,761	30	0
Medycyna Weterynaryjna- Veterinary Medicine Science and Practise	2012	1	0,203	10	1
	2018	4	0,197	15	0
	2011	1	-	-	2
Journal of Virological Methods	2013	1	1,883	20	10
Annals of Agricultural and Environmental Medicine	2018	1	1,116	30	0
Przegląd Hodowlany	2010	1	-	2	0
Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego	2010	1	-	6	0
<b>SUMA</b>		<b>25</b>	<b>25,801</b>	<b>528</b>	<b>114</b>

16.04.2019 Monika Oleck